

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE ALGUNAS MACROALGAS DEL CARIBE COLOMBIANO

Antimicrobial Activity Study for Alcohol Extracts of Some Macroalgae from Colombian
Caribbean Sea

Alejandro Martínez M.^{1*}, Luz Adriana Arias¹, José Luis Rueda M.¹,
Martha Cecilia Diaz R.³, Germán Bula-Meyer²

RESUMEN

Los extractos metanólicos de las especies de macroalgas del Caribe Colombiano: *Dictyota bartayresiana*, *D. pulchella*, *Sargassum cymosum*, *Padina boergesenii*, *Laurencia microcladia*, *Digenia simplex*, *Cladophyllum schnnetteri* y *Colpomenia sinuosa*; se ensayan para determinar su actividad antibacteriana *in-vitro* contra microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*. Los ensayos de actividad antimicrobiana se llevan a cabo según una modificación de la técnica de difusión en placas de agar, descrita por Bauer y Kirby. Las especies que muestran actividad son: *Dictyota bartayresiana*, *D. pulchella*, *Padina boergesenii* y *Laurencia microcladia*.

Palabras claves: Macroalgas, Productos naturales marinos, Actividad antimicrobiana, Extractos marinos.

ABSTRACT

Methanol extracts from eight Colombian Caribbean sea macroalgae: *Dictyota bartayresiana*, *Dictyota pulchella*, *Sargassum cymosum*, *Padina boergesenii*, *Laurencia microcladia*, *Digenia simplex*, *Cladophyllum schnnetteri* and *Colpomenia sinuosa*, are tested to determine its *in vitro* antimicrobial activity against some pathogen microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. The antimicrobial activity tests are carried out according to agar diffusion technique described by Bauer and Kirby. Species that shown activity are *Dictyota bartayresiana*, *D. pulchella*, *Padina boergesenii* and *Laurencia microcladia*.

Key Words: Macroalgae, Marine natural products, Antimicrobial activity, Marine Extracts

1 Grupo de Investigación, Productos Naturales Marinos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia.

2 Departamento de Biología, Universidad del Magdalena. AA. 890. Santa Marta, Colombia.

3 Facultad de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Colombia.

* Autor a quien debe enviarse correspondencia: Alejandro Martínez M., Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Apartado aéreo 1226, Medellín, Colombia. Tel: (574) 210 5475, Fax: (574) 210 5456, dirección electrónica: amart@muiscas.udea.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

Las macroalgas marinas tropicales han demostrado ser una fuente natural rica en compuestos bioactivos con potencial biomédico, particularmente para la producción de antibióticos y otras drogas. La actividad antimicrobiana se ha reportado ampliamente en las algas marinas y en especies de varias partes del mundo como las zonas marinas del Mediterráneo, India, China, Australia, Argentina y Canadá. En el caso particular de las algas del mar Caribe, se reportó el estudio de la actividad antimicrobiana de más de 150 especies de algas recolectadas en Puerto Rico (1).

La producción de metabolitos secundarios bioactivos en algas marinas bénticas ha sido asociada principalmente con la protección contra herbívoros (2-4).

En el caso de las algas pardas, y muy especialmente las del orden Dictyotales, estas son ricas en metabolitos tipo terpenoide. De este orden, el género *Dictyota* ha sido el más estudiado y ha llevado al aislamiento de cerca de 125 diferentes diterpenos de 17 clases de esqueletos, de 18 especies recolectadas en todos los océanos del mundo. El estudio del género *Dictyota* comenzó hace aproximadamente 28 años; *D. dichotoma* es la especie que ha sido más ampliamente estudiada. Esta especie contiene especialmente sustancias tipo diterpenoides, aunque se ha notado un amplio rango de variaciones de sus constituyentes, dependiendo del tiempo y localización de la recolección (5). Los componentes aislados incluyen diterpenoides tipo dolabelano con actividad contra microorganismos patógenos (6), los acutiloles (véase a manera de ejemplo la estructura del acutilol-A, en la Figura 1), que son compuestos que muestra-

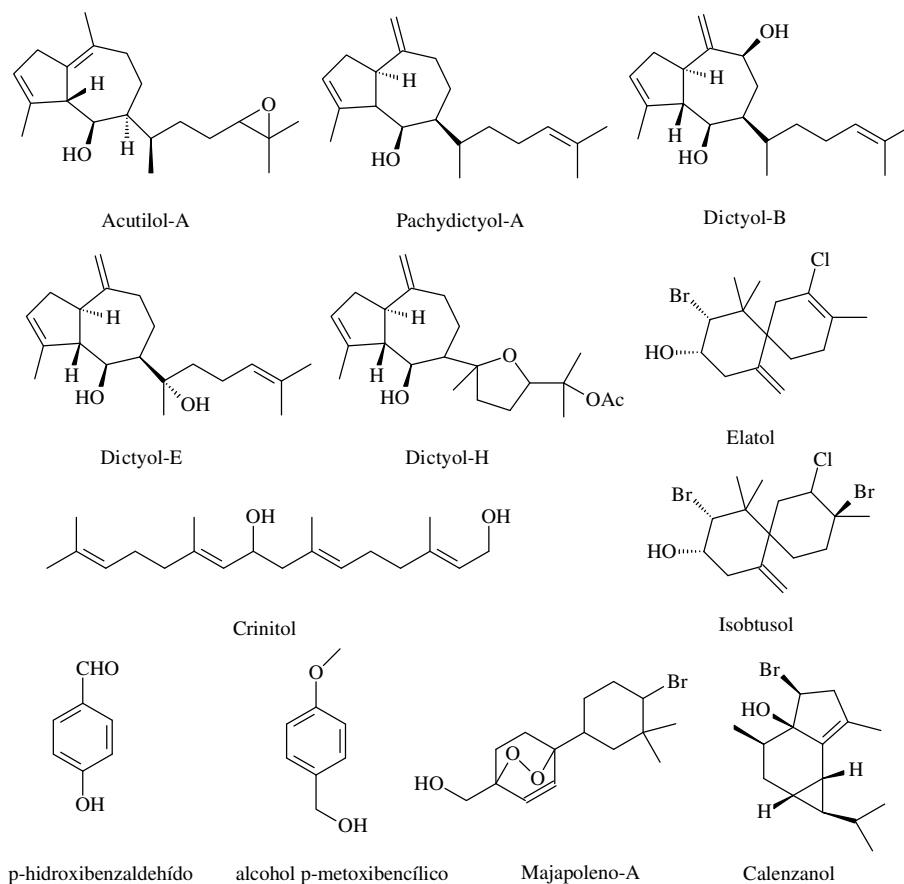


Figura 1. Estructuras de varios metabolitos bioactivos aislados de Macroalgas marinas

ron una fuerte actividad repelente contra diversos predadores (7), varios diterpenos del tipo guaiano, como el pachydictiol-A, dictiol-B, dictiol-E y dictiol-H entre otros (Figura 1), los cuales muestran fuerte actividad repelente contra varios tipos de herbívoros. Además, el pachydictiol-A mostró una mediana actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (8).

El género *Sargassum* ha tenido un menor estudio químico, comparado con otros géneros, pero aún así, se ha reportado su actividad antimicrobiana contra Gram-positivos y Gram-negativos. El alga parda *Sargassum tortile* produce un alcohol diterpeno acíclico, el crinitol (Figura 1), el cual se aisló inicialmente de *Cystoseira crinita* (Cystoseiraceae). Este compuesto mostró una moderada actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* y fue menos activo contra *Staphylococcus aureus*. En este trabajo se encontró que los dos antioxidantes comerciales BHA y BHT, potencian la actividad de este compuesto, disminuyendo su concentración mínima inhibitoria (9).

El alga parda *Padina boergesenii* recolectada en las costas de Tamil Nadu, India, y en diferentes estaciones; mostró una actividad antimicrobiana intermedia contra *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (10). De esta alga, la fracción metanólica fue la que presentó mayor actividad, y de esta fracción, la zona que revelaba con yodo a un Rf de 0.44 fue la más activa (11).

En el caso de las algas rojas, estas presentan contenidos de esteroides que varían entre el 14 y el 20% de su peso seco. El colesterol es el esteroide más distribuido en las algas rojas; además estas se caracterizan por contener sustancias terpenoides halogenadas, y muy especialmente sesquiterpenos brominados. El género *Laurencia* es único, debido a su capacidad de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios halogenados con diversas características estructurales dependiendo de las especies y las localidades de recolección. En el género *Laurencia* se ha reportado la producción de terpenoides y

acetogéninas de tipos complejos, uno de los metabolitos más conocidos es el elatol (Figura 1), un sesquiterpenoide citotóxico, ictiotóxico, insecticida y que repele la alimentación de los peces arrecifales. El iso-obtusol, (Figura 1) aislado de *L. obtusa*, que también posee una potente actividad antimicrobiana contra bacterias marinas. De otras tres especies del género: *L. mariannensis*, *L. majuscula* y *L. nidifica*; se aislaron cuatro compuestos, que mostraron una actividad antimicrobiana notable. También de este género y más específicamente de *L. papillosa*, se aislaron dos compuestos aromáticos con actividad antimalárica, *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzil alcohol (12-13). De la especie *L. majuscula* se aisló un sesquiterpenoide, el majapoleno-A, (Figura 1) el cual mostró actividad en un ensayo de citotoxicidad contra líneas celulares NCI-60 (14). También, de *L. microcladia* se aisló un sesquiterpeno, el calenzanol, (Figura 1), el cual posee un esqueleto que no había sido descrito previamente, estableciéndose así, una nueva clase de sesquiterpeno con un nuevo esqueleto, el calenzanano.

Aunque la función de estos metabolitos secundarios no ha sido claramente descrita, se ha sugerido que estos metabolitos les sirven a las macroalgas que los contienen, como repelentes contra los herbívoros marinos (15).

En las algas verdes, las familias Codiaceae, Udoteaceae y Caulerpáceae, se sabe que producen un grupo relacionado de sesquiterpenoides y diterpenoides que exhiben una amplia bioactividad en ensayos farmacológicos, aproximadamente 70 metabolitos secundarios aislados de estas algas (16).

En general, la revisión bibliográfica hecha para el presente trabajo muestra que en las algas, las sustancias antimicrobianas y con otras actividades biológicas, son mecanismos de defensa química contra sus predadores (17-21).

Hasta nuestro conocimiento, sólo existe un trabajo sobre la actividad antimicrobiana de

macroalgas marinas colombianas, donde se reportan los resultados del estudio de la actividad contra microorganismos patógenos, de los extractos de diez especies de macroalgas del litoral Atlántico: *Halimenes opuntia*, *Ulva lactuca*, *Gracilaria mamillaris*, *Agardhiella tenera*, *Caulerpa racemosa*, *Penicillus capitatus*, *Penicillus pycniformis*, *Gracilaria cilindrica*, *Caulerpa sertulorioides* e *Hypnea musciformis*; de las cuales las tres últimas especies mostraron actividad interesante, a juicio de los autores, aunque no presentan resultados cuantitativos (22).

En el año de 1988, la institución estadounidense Harbor Branco Oceanographic Institution y la Universidad del Magdalena de Colombia, realizaron una expedición conjunta para evaluar recursos marinos entre los que se contaban 100 especies de macroalgas del Caribe Colombiano, realizando pruebas de actividad biológica con los extractos contra diferentes clases de tumores, sida y hongos patógenos, sin encontrar los resultados esperados por los investigadores (23).

A continuación se presentan los resultados del estudio de actividad antimicrobiana de ocho especies de macroalgas del Caribe Colombiano.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección de las especies

Las macroalgas pardas *Dictyota bartayresii* J. V. Lamour, *D. pulchella* Hörning & Schnetter, *Padina boergesenii* Allender & Kraft, *Colpomenia sinuosa* (Roth) Derbès & Solier, *Sargassum cymosum* C. Agardh, *Cladophyllum schnetteri* Bula-Meyer, y las algas rojas *Laurencia microcladia* Kütz y *Digenia simplex* (Wülfen) C. Agardh, fueron recolectadas en las Ensenadas de Bahía Concha, Chengue y Chenguito, Parque Natural Nacional Tayrona (Departamento del Magdalena) todas sobre la plataforma rocosa en el intermareal.

Durante el periodo comprendido entre Marzo-Mayo del 2000, durante la estación seca mayor, cuando se establecen los vientos Alisios (finales de diciembre-finales de abril) y en el mes de septiembre, principios de la estación húmeda mayor.

Las macroalgas fueron lavadas varias veces con agua dulce y limpiadas de la epibiosis para evitar la contaminación, posteriormente se secaron al aire y a la sombra, y se empacaron en bolsas plásticas para ser enviadas al Laboratorio de Productos Naturales Marinos, de la Universidad de Antioquia en Medellín.

Extracción

Las algas se secaron en estufa de convección de aire, a 40°C por 8 horas y se molieron para ser extraídas. El alga seca y molida se sometió a extracción exhaustiva con metanol destilado. La solución resultante se filtró y evaporó a presión reducida y baja temperatura por medio de un rotaevaporador. El extracto así obtenido, se envasó en recipientes de vidrio adecuados y se guardó en congelador a -18°C, hasta su utilización para los bioensayos y el estudio químico.

Ensayo Biológico

A los extractos metanólicos se les realizó un ensayo previo para probar su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Gram-). De esta manera se seleccionaron las especies de algas que debían ser fraccionadas por cromatografía biodirigida con el fin de aislar los compuestos bioactivos.

El ensayo biológico se realizó utilizando la metodología descrita por Kirby-Bauer en 1996. Como medio de cultivo se utilizó Agar nutritivo. Los extractos y fracciones se impregnaron en sensidiscos de papel Whatman N° 1 previamente esterilizados, colocando 500 mg de extracto (disuelto en la mezcla etanol-agua 3:2) por sensidisco. Como referencia se utilizaron sensidiscos comerciales de gentamicina 10 mg. Todos los ensayos se hicieron por triplicado, in-

cubando a 37°C, y haciendo lecturas de halos de inhibición a las 24 y 48 horas.

Resultados

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana de

las especies estudiadas. De acuerdo con estos resultados, de las ocho especies de microalgas analizadas en este trabajo, cuatro mostraron actividad contra por lo menos un microorganismo *Gram*-positivo, pero ninguna fue activa contra el microorganismo *Gram*-negativo *E. coli*.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos crudos orgánicos de ocho macroalgas sobre tres diferentes bacterias

Especie	Zona de inhibición (mm) ^a		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Colpomenia sinuosa</i>	0.0	0.0	0.0
<i>Dictyota bartareysiana</i>	9.8 ± 0.09	11.0 ± 0.14	0.0
<i>Dictyota pulchella</i>	10.0 ± 0.07	10.0 ± 0.03	0.0
<i>Padina boergesenii</i>	0.0	9.0 ± 0.09	0.0
<i>Sargassum cymosum</i>	0.0	0.0	0.0
<i>Cladophyllum schnetterii</i>	0.0	0.0	0.0
<i>Digenia simplex</i>	0.0	0.0	0.0
<i>Laurencia microcladia</i>	11.1 ± 0.06	0.0	0.0
Gentamicina (Referencia)	27.3 ± 0.52	29.1 ± 0.26	11.0 ± 0.06

a. Diámetro de la zona de inhibición, incluyendo el disco de 6 mm, (promedio ± error estándar de tres réplicas). En ninguno de los ensayos de control se observó la formación del halo de inhibición, siempre se obtuvieron valores de 0.

Las algas pardas *D. bartayresiana* y *D. pulchella*, mostraron actividad muy similar (halos de inhibición que oscilan en el rango de 9.8 a 11.0 mm), contra los microorganismos *Gram*-positivos *S. aureus* y *B. cereus*. La actividad contra *S. aureus* ya había sido reportada por Ballantine en varias especies del género *Dyctiota* recolectadas en Puerto Rico, como (*D. bartayresii* Lamour, *D. cervicornis* K?tz, *D. ciliolata* K?tz, *D. divaricata* Lamour y *D. Linearis* Lamour), sin embargo esta es la primera vez que se reporta contra *B. cereus*.

El alga parda *P. boergesenii* mostró actividad contra *B. cereus*, pero resultó inactiva contra *S. aureus*. Sin embargo la especie *P. gymnospora* (K?tz.) Sond. de Puerto Rico, fue reportada

como inactiva contra *S. aureus*, y otros microorganismos ensayados.

Los resultados de inactividad de las especies *Colpomenia sinuosa*, *Digenia simplex*, y *Sargassum cymosum*, están de acuerdo con lo reportado para las mismas especies de Puerto Rico, las cuales fueron ensayadas contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Por su parte, el alga roja *L. microcladia* mostró actividad solo contra *S. aureus*. Este resultado concuerda con lo reportado para el alga portorriqueña *Laurencia sp.*, que además es activa contra *B. subtilis*.

Estos resultados muestran que de las especies colombianas estudiadas en el presente trabajo, las algas pardas de la familia Dictyotaceae (*D. bartareysiana*, *D. pulchella* y *P. boergesenii*) presentan actividad contra las bacterias *Gram*-positivas ensayadas. Por otro lado, al comparar con estudios similares, como es el caso del trabajo de Ballantine y col. en Puerto Rico, con algas del Caribe Puertorriqueño; se encuentra también que la mayoría de las especies de macroalgas analizadas en dicho trabajo, son especialmente activas contra microorganismos *Gram*-positivos.

Se observa que las sustancias activas presentes en los extractos tienen en general un espectro de actividad reducido, puesto que actuaron sólo contra las bacterias *Gram*-positivas. La mayor susceptibilidad de las bacterias *Gram*-positivas hacia los extractos algales activos, ha sido encontrada en regiones tropicales y subtropicales (25-27). Esta diferencia de sensibilidad entre las bacterias *Gram*-positivas y las bacterias *Gram*-negativas, es presumiblemente debida a la naturaleza química de los extractos (25, 26). Sin embargo se ha encontrado que las fracciones de algunos extractos crudos algales presentan actividad contra bacterias *Gram*-negativas. Esto puede deberse a que los metabolitos secundarios responsables quedaron enmascarados en los extractos crudos (27, 28).

El hecho de que las macroalgas del género *Dyctiota* analizadas en este trabajo, y otras especies del mismo género del Caribe Puertorriqueño, no hayan mostrado actividad, sugiere a juicio de otros autores que existen factores que pueden afectar la bioactividad de las algas, tales como el estado reproductivo, su localización

geográfica y la variación de las estaciones climáticas. Esto es importante para tener en cuenta en los futuros estudios que se realicen sobre la bioactividad de estos organismos.

El fraccionamiento cromatográfico biodirigido con los bioensayos antimicrobianos, permitió aislar una fracción activa de la especie *D. bartareysiana*. Esta fracción mostró halos de inhibición comparativamente mayores que los obtenidos con el extracto crudo (halo de inhibición de la fracción contra *B. cereus*: 11.6 mm, halo de inhibición de la fracción contra *S. aureus*: 13.1 mm), especialmente contra *S. aureus*. Esta fracción al analizarla por CCF con la mezcla hexano/acetato de etilo 2:1, muestra varias manchas en el rango de Rf 0.6-0.3. El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, mostró que contiene una mezcla compleja de componentes, probablemente de tipo terpenoide de acuerdo al patrón de fragmentación característico de estos compuestos. Actualmente se continúa trabajando en el aislamiento y dilucidación estructural de los componentes responsables de la actividad biológica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Antioquia y al Comité para el Desarrollo de la Investigación CODI, por la financiación de este proyecto, también reconocen el apoyo valioso del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, y al profesor Carlos López, del Departamento de Química, por los análisis por CG-EM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ballantine, D.L., W. H. Gerwick, S. M. Velez, E. Alexander & P. Guevara. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiología*. Vol 151/152: 463 – 469, 1987.
2. Faulkner, D. J., Highlights of Marine Natural Products (1972-1999), *Nat. Prod. Rep.* 17: 1-6 (2000).
3. Faulkner, D. J., Marine Natural Products, *Nat. Prod. Rep.* 18: 1-49 (2001).

4. Pereira, R. C., Texeira, V. L., Kelecom, A., Chemical defense against Herbivores in Marine Algae. 1. The Brown Alga *Dyctiota dichotoma* (Hudson) Lamouroux from Brazil, An. Acad. Bras. Ci. 66(2): 230-235 (1994).
5. Duran, R.; E. Zubia; M. J. Ortega; & J. Salvá. New Diterpenoids from the Alga *Dictyota dichotoma*. Tetrahedron. 53: 8675 – 8688, 1997.
6. Amico, V, G. Oriente, M. Piatelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno & L. Mayol. Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *D. dichotoma*. Tetrahedron. 36: 1409 – 14, 1980.
7. Fenical, W.; I. G. Hardt; G. Cronin; M. E. Hay. Acutilols, potent herbivore feeding deterrents from the tropical marine alga, *Dictyota acutiloba*. Phytochemistry. 43: 71-73, 1996.
8. Hirschfield, D. R., W. Fenical, G. H. Y. Lin, R. M. Wing, P. Radlick & J. J. Sims. Marine Natural Products. VIII. Pachydictyol A, An Exceptional Diterpene Alcohol from the Brown Alga *Pachydictyon coriaceum*. J. Am. Chem. Soc. 95 : 4049 – 4050, 1973.
9. Kubo, I., M. Himejima, K. Tsujimoto, H. Muroi. Antibacterial activity of crinitol and its potentiation. J. Nat. Prod. 55: 780 – 785, 1992.
10. Arun Kumar, K., R. Rengasamy. Evaluation of Antibacterial Potential of Seaweeds Occuring along the Coast of Tamil Nadu, India against the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Dye. Bot. Mar. 43: 409 – 415, 2000.
11. Arun Kumar, K., R. Rengasamy. Antibacterial Activities of Seaweed Extracts/Fractions Obtained through a TLC Profile against the Phytopathogenic Bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Bot. Mar. 43: 417 – 421, 2000.
12. Vairapan, C. S., M. Daitoh, M. Suzuki, T. Abe, M. Masuda. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. Phytochemistry. 58 : 291 - 297, 2001.
13. Wright, A. D. y G. M. König. Antimalarial Activity: The Search for Marine-Derived Natural Products with Selective Antimalarial Activity. J. Nat. Prod. 59: 710 - 716, 1996.
14. Erickson, K. L., J. A. Beutler, G. N. Gray, J. H. Cardellina II, M.R. Boyd. Majapolene-A, a cytotoxic peroxide, and related sesquiterpenes from the red alga *Laurencia majuscula*. J. Nat. Prod. 58 : 1848 -1860, 1995.
15. Hay, M. E., y W. Fenical. Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defense. Ann. Rev. Ecol. Syst. 19: 111 – 145, 1988.
16. Fenical, W. Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical marine brown algae *Styopodium zonale*. J. Org. Chem. 46: 22 – 27, 1981.
17. Bula-Meyer, G. Micro y macroalgas marinas alelopáticas: Biología, toxinas y significado ecofisiológico (revisión). Revista Ingeniería Pesquera, edición especial. A. Lacera ed. 9 (1-2): 110, 1989.
18. Paul, V.J. Feeding deterrent effects of algal natural products. Bull. Mar. Sci. 41: 514 – 522, 1987.
19. Paul, V.J., y W. Fenical. Chemical defense en tropical marine algae, order Caulercales. Mar. Ecol. Prog. Ser. 34: 157 – 169, 1986.
20. Paul, V. J., y W. Fenical. Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of phylum Chlorophyta. 1: 1 – 29. En: P. J. Scheuer, ed. BioOrg Mar. Chem. Berlin, Springer-Verlag, 1987.
21. Pereira, R. C., V. L. Texeira & A. Kelecom.. Chemical Defenses Against Herbivores in Marine Algae. 1. The brown Alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux from Brazil. Ann. Acad. bras. Ci. Vol 66: 229 – 235, 1994.
22. Nuñez, E., Investigación de Actividad Antibacteriana de Extractos de Algunas Algas Marinas Colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 2: 125 – 130, 1972.
23. Bula-Meyer, G. Las Macroalgas Bénticas Marinas como Recurso Potencial Económico en Colombia, Rev. Acad. Col. Cienc. Exactas 17: 383-387, 1989.
24. Martínez, A., Estudio Químico y de Actividad Biológica de Esponjas Marinas Colombianas del Género *Ircinia*, Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, Bogotá, 1996.
25. Pesando, D. and Caram B. Screening of marine algae from the French Mediterranean Coast. Antibacterial and Antifungal Activity. Botanica Mar. No. 27, 381-386, 1984.
26. Padmini, P. S., Sreenivasa-Rao, P., and Karmarkar, M. Antibacterial Activity from Indian Species of *Sargassum* Aquat. Bot. (31), 295-298, 1988.
27. Campos-Takaki, G., Dui, M. B., Koenig, M. L. and Pereira, E. C. Screening of Marine Algae from Brazilian Northeastern Coast for Antimicrobial Activity. Botanica Mar. (31), 375-377, 1988.
28. Sreenivasa-Rao, P. and Parekh, K. S. Antibacterial Activity of Indian Seaweed Extracts. Botanica Mar. (24), 577-582, 1981.

“*Germán: Este es un pequeño fruto de todo lo que nos enseñaste, descansa en paz.*” A. M.

Fecha de recibo: Septiembre 27 de 2002

Fecha de aceptación: Octubre 29 de 2002